

## To Study the Association between AcrAB and Qep A Efflux Pumps and Ciprofloxacin Resistance among *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* Clinical Strains

Mohsen Heidary<sup>1\*</sup>, Aghil Bahramian<sup>2</sup>, Hossein Goudarzi<sup>3</sup>, Gita Eslami<sup>3</sup>, Ali Hashemi<sup>4</sup>, Saeed Khoshnood<sup>5</sup>

1- PhD Student in Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- MSc Student in Medical Microbiology, Department of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Professor, Department of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5- PhD Student in Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Received: 1 Jan 2016, Accepted: 20 Apr 2016

### Abstract

**Background:** The efflux pumps are one of the main mechanisms of resistance to antibiotics in *E. coli* and *K. pneumoniae* strains. The aim of this study is to study the association between genes coding efflux pumps AcrAB and Qep A and ciprofloxacin resistance among *E. coli* and *K. pneumoniae* clinical strains

**Materials and Methods:** This study was done on 100 strains of *E. coli* isolated from Taleghani and Labbafinejad Hospitals and 100 strains of *K. pneumoniae* isolated from Taleghani and Mofid Children Hospitals. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disk diffusion method based on CLSI guidelines. Identification of genes encoding efflux pumps Acr AB and Qep A was done by PCR technique.

**Results:** In this study, fosfomycin and imipenem had the best effect against *E. coli* clinical isolates and fosfomycin and tigecycline had the best effect against *K. pneumoniae* clinical isolates. PCR assay demonstrated that the prevalence of *AcrA*, *AcrB* and *QepA* genes among *E. coli* isolates were 92%, 84% and 0%, respectively and among *K. pneumoniae* isolates were 94%, 87% and 4%, respectively.

**Conclusion:** The prevalence of genes encoding efflux pumps in *E. coli* and *K. pneumoniae* clinical strains, which causes resistance to fluoroquinolones, is cause for concern. Therefore, controlling infection and preventing the spread of drug-resistant bacteria needs to manage medication carefully and identify resistant isolates.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Efflux pump, Fluoroquinolone, Antibiotic sensitivity

\*Corresponding Author:

Address: Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: Mohsenheidary40@gmail.com

## بررسی ارتباط پمپ‌های تراوشی Qep A و AcrAB و مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه‌های بالینی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

محسن حیدری<sup>۱\*</sup>، عقیل بهرامیان<sup>۲</sup>، حسین گودرزی<sup>۳</sup>، گیتا اسلامی<sup>۳</sup>، علی هاشمی<sup>۴</sup>، سعید خشنود<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۵- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** پمپ‌های تراوشی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه هستند. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط رخداد ژن‌های کدکننده پمپ‌های تراوشی Qep A و AcrAB در سویه‌های بالینی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه با مقاومت نسبت به سیپروفلوکسازین می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه روی ۱۰۰ سویه اشرشیا کلی جدا شده از بیمارستان‌های لبافی نژاد و طالقانی و ۱۰۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان‌های کودکان مفید و طالقانی شهر تهران انجام شد. تست‌های حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و بر اساس رهنمودهای CLSI انجام گردید. شناسایی ژن‌های کدکننده پمپ‌های تراوشی Qep A و AcrAB با استفاده از تکنیک PCR انجام گرفت.

**یافته‌ها:** در این مطالعه، فسفومايسين و ایمی پنم بهترین اثر را علیه سویه‌های اشرشیا کلی و فسفومايسين و تیجیسیکلین بهترین اثر را علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه داشتند. نتایج PCR نشان داد که میزان شیوع ژن‌های Acr B، A، Qep A و AcrAB در سویه‌های اشرشیا کلی به ترتیب ۹۲، ۸۴ و صفر درصد و در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۹۴، ۸۷ و ۴ درصد بود.

**نتیجه‌گیری:** شیوع ژن‌های کدکننده پمپ‌های تراوشی در سویه‌های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه که عامل مقاومت به سیپروفلوکسازین هستند، موجب نگرانی است. از این رو، برای کنترل عفونت و جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم به دارو، نیاز به مدیریت دقیق در تجویز دارو و شناسایی ایزوله‌های مقاوم می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** کلبسیلا پنومونیه، پمپ تراوشی، فلوروکینولون، حساسیت آنتی‌بیوتیکی

\* نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروب شناسی

Email: Mohsenheidary40@gmail.com

## مقدمه

اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جزو پاتوژن‌های فرصت طلب گرم منفی هستند و از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند (۱). اشرشیا کلی عامل اصلی عفونت مجاری ادراری و کلبسیلا پنومونیه به همراه سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر جزو عوامل مهم ایجادکننده پنومونی بیمارستانی به ویژه در بیمارانی هستند که به مدت طولانی در بیمارستان بستری می‌شوند (۲). افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین سویه‌های بیمارستانی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری‌ها محدود کرده است (۳). این باکتری‌ها از موارد مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان هستند (۴). کلبسیلا پنومونیه یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می‌باشد. این باکتری موجب عفونت‌های بسیار گوناگون می‌گردد و به ویژه در نوزادان موجب پنومونی، سپتی سمی، اسهال ایجاد آبه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت عفونت‌های ادراری و باکتری می‌شود (۱، ۵-۸). چهار میلیون نوزاد در هر سال فوت می‌کنند (۹). بیشترین میزان مرگ و میر در نوزادان به عفونت‌های پنومونی، سپتی سمی، مننژیت و اسهال مربوط می‌باشد. نوزادان به دلیل نداشتن سیستم ایمنی کامل آسیب‌پذیرتر هستند (۱۰). بیماری‌هایی که عامل آن‌ها اشرشیا کلی است، در دو دسته عفونت‌های روده‌ای و غیر روده‌ای قرار دارند. بیشتر موارد آلودگی به صورت عفونت‌های غیرروده‌ای و به خصوص عفونت‌های ادراری در سالمندان دیده شده است. میزان آلودگی به این باکتری در دهه گذشته دو برابر شده است و سالیانه بیش از ۱۷ هزار مورد ابتلا به این باکتری در بیمارستان‌ها گزارش می‌شود. عفونت‌های گوارشی ناشی از این باکتری بسته به سویه خاص باکتری به صورت اسهال ساده تا اسهال همراه با خون است و با تأمین آب و الکترولیت‌های مورد نیاز بدن درمان می‌شود و نیازی به مصرف آنتی‌بیوتیک نیست. به طور کلی، اشرشیا کلی علت شایع مسمومیت غذایی است (۸، ۹).

مقاومت ضد میکروبی به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح می‌باشد (۱۱) که بیماران را در سرتاسر بیمارستان‌های جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲، ۱۳)، به همین جهت سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامید (۱۴، ۱۵). این سازمان توصیه‌های زیادی را برای کنترل و جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دولت‌ها کرده است که مهم‌ترین آن‌ها شامل ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها، فروش آنتی‌بیوتیک‌ها فقط با نسخه پزشکان، کنترل و جلوگیری از عفونت‌ها می‌باشد (۱۴). درمان عفونت‌های بیماران آلوده به ارگانسیم‌های مقاوم به چندین دارو، تبدیل به یک مشکل مهم شده است (۵). اگرچه فلوروکینولون‌ها داروهای مناسب جهت درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی هستند، اما در حال حاضر مقاومت دارویی به این آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است (۲). مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه شامل بتالاکتامازها، جهش در پورین‌ها و نیز پمپ‌های تراوشی هستند که پمپ‌های تراوشی به عنوان یکی از موارد اصلی دفاع این باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (۱۶، ۱۷). Acr B, Qep A و Acr A از جمله مهم‌ترین پمپ‌های تراوشی هستند که باعث مقاومت سویه‌های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به فلوروکینولون‌ها می‌گردند. ژن Qep A (پمپ تراوشی کینولونی) بر روی پلاسمید قرار گرفته و دارای جزء ترانسپوزونی است که در دوطرف آن نسخه‌هایی از IS26 وجود دارد (۱۸). این ژن کد کننده یک پمپ تراوشی کینولونی (Qep A) است که متعلق به خانواده MFS (زیر خانواده تسهیل کننده عمده) می‌باشد (۱۹، ۲۰). پروتئین Qep A یک ترانسپورتر وابسته به پروتون است که باعث مقاومت کینولونی هیدروفیلیک به ویژه در برابر سپروفلوکسازین، نروفلوکسازین و انروفلوکسازین می‌گردد (۲۱). ژن‌های *acrA* و *acrB* بر روی کروموزوم قرار دارند و یک پمپ تراوشی چند دارویی را کد می‌کنند که در اکثر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد (۲۲). پمپ‌های تراوشی

در بیمارستان‌های کودکان مفید و طالقانی جمع‌آوری شد. نمونه‌های مشکوک پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، با روش‌های استاندارد و افتراقی میکروبیولوژی شناسایی شدند. در مجموع، ۱۰۰ ایزوله /شرشیا کلی و ۱۰۰ کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری گردید.

### جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها

نمونه‌ها برای تأیید بر روی محیط کشت EMB، مک کانکی آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون، از کلنی‌های مشکوک به شرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه لام مستقیم تهیه شد و در صورت دیدن باسیل‌های گرم منفی، کارهای تشخیصی زیر انجام گردید: از تست‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI، MR، VP، لیزین دکربوکسیلاز، سیرتات، اوره و غیره استفاده گردید.

### بررسی الگوی مقاومت دارویی

مقاومت دارویی سویه‌های شرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، ایمی پنم، سفوتاکسیم، لووفلوکسازین، فسفومایسین، آمپی سیلین، سیپروفلوکسازین، سفودوکسیم، تیجیسیکلین، سفتازیدیم به روش انتشار دیسک در آگار و با استفاده از دیسک‌های شرکت ماست انگلستان و طبق رهنمودهای CLSI بررسی شد. به طور خلاصه، چند کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها از محیط مولر هیتون برات برداشته شد و در ۰/۹ درصد محلول نمکی حل شد تا به غلظت نیم مک فارلند رسید. سپس مقدار مشخصی از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را با فاصله مناسب روی محیط گذاشته و پلیت‌های را برای مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس نتایج را با استفاده از دستورالعمل CLSI بررسی کردیم.

AcrA و AcrB پمپ‌های اصلی ایجادکننده مقاومت ذاتی سویه‌های شرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه علیه فلوروکینولون‌ها به ویژه سیپروفلوکسازین از طریق تغییر نفوذپذیری در غشای پروکاریوتی، دفع آنتی‌بیوتیک به محیط خارجی و کاهش غلظت داخلی آنتی‌بیوتیک می‌باشند (۲۳). پمپ‌های تراوشی AcrA و AcrB جزو افلاکس پمپ‌های خانواده RND طبقه‌بندی می‌شوند که این خانواده از مهم‌ترین پمپ‌های تراوشی MDR هستند و نقش اصلی در مقاومت چند دارویی در برابر باکتری‌ها ایفا می‌کنند (۲۳). این ژن‌ها قادرند از یک باکتری به باکتری دیگر، از یک انسان به انسان دیگر و حتی از یک کشور به کشور دیگر منتقل شوند و به عنوان یک تهدید مهم در بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها می‌باشند. بعضی پاتوژن‌های حاوی این ژن‌ها به اشتباه ممکن است در تست‌های معمول آزمایشگاهی حساس در نظر گرفته شوند و در نتیجه عدم تشخیص آن‌ها منجر به این امر گردد که بیماران، آنتی‌بیوتیک‌های غیر موثر را دریافت کنند و در نهایت پاتوژن‌های مقاوم تر به وجود بیایند و گسترش یابند. اطلاعات کمی در مورد فراوانی این ژن‌ها در ایران وجود دارد. از این رو، جهت تشخیص سویه‌های شرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن‌های مقاومت به ویژه جهت درمان بهتر بیماران و جلوگیری از انتشار این ژن‌ها به دیگر باکتری‌ها نیاز به بررسی دقیق میزان شیوع آن‌ها می‌باشد. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پمپ‌های تراوشی Qep A و AcrAB و مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه‌های بالینی شرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا از بیماران بستری در بیمارستان‌های منتخب شهر تهران طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام گرفته از نوع توصیفی می‌باشد. در این پژوهش، سویه‌های مشکوک به شرشیا کلی از بیماران بستری در بیمارستان‌های لبافی نژاد و طالقانی و سویه‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری

## استخراج DNA

۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۳ میکرولیتر DNA در نظر گرفتیم. به منظور دقت و صحت انجام تست برای هر بار انجام واکنش، نمونه های کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. به همین جهت در محاسبه مقادیر واکنش، کنترل های مثبت و منفی نیز منظور گردید. در این مطالعه از سویه های حاوی ژن های فوق به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. کنترل منفی برای چک کردن عدم آلودگی مواد PCR استفاده گردید. برای تکثیر ناحیه درونی ژن های نام برده، مجموعه ای از پرایمرها طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). مقادیر لازم برای انجام PCR در جدول ۲ آورده شده است.

برای استخراج DNA، ابتدا مقدار ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری کشت داده شده در محیط TSB سانتریفیوژ شده و سپس از رسوب حاصل برای استخراج DNA استفاده شد. استخراج DNA سویه های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه بر طبق پروتکل کیت شرکت Roche انجام گردید.

## انجام PCR برای ژن های Qep A , Acr B و Acr A

برای انجام واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تهیه شد. برای تهیه این مخلوط، ابتدا مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش را برای یک نمونه محاسبه کرده و سپس بسته به تعداد نمونه، مقادیر را برای تعداد نمونه مورد نظر محاسبه کردیم. برای هر نمونه

## جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های Acr A ، Acr B و QepA در سویه های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

| نام پرایمر | ژن های شناسایی شده | توالی پرایمر         | اندازه (جفت باز) |
|------------|--------------------|----------------------|------------------|
| QeA-F      | qep A              | CTGCAGGTA CTGCGTCATG | ۴۰۳              |
| QepA-R     |                    | CGTGTGCTGGAGTTCTTC   |                  |
| Acr A-F    | acr A              | TCTGATCGACGGTGACATCC | ۱۵۷              |
| Acr A-R    |                    | TCGAGCAATGATTTCTGCG  |                  |
| Acr B-F    | acr B              | CAATACGGAAGAGTTTGGCA |                  |
| Acr B-R    |                    | CAGACGAACCTGGGAACC   | ۶۴               |

## جدول ۲ شرایط لازم برای انجام PCR برای ژن های Acr A ، Acr B و QepA در سویه های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

| -----               | دما (سانتی گراد) |      |      | زمان     |          |          |
|---------------------|------------------|------|------|----------|----------|----------|
|                     | QepA             | AcrA | AcrB | QepA     | AcrA     | AcrB     |
| دنا تورا سیون اولیه | ۹۴               | ۹۴   | ۹۴   | ۵ دقیقه  | ۵ دقیقه  | ۵ دقیقه  |
| دنا تورا سیون       | ۹۴               | ۹۴   | ۹۴   | ۴۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه |
| آنلینگ              | ۵۱               | ۵۷   | ۵۲   | ۴۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه |
| طولیل سازی          | ۷۲               | ۷۲   | ۷۲   | ۴۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه |
| طولیل سازی نهایی    | ۷۲               | ۷۲   | ۷۲   | ۵ دقیقه  | ۵ دقیقه  | ۵ دقیقه  |
| چرخه                | ۳۶               | ۳۶   | ۳۶   | -----    | -----    | -----    |

نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت.

## انجام الکتروفورز

محصولات PCR را بر روی ژل آگارز ۱ درصد با بافر تریس بورات (TBE)EDTA قرار دادیم و سپس ژل را با اتیدیوم بروماید رنگ نمودیم. پس از پایان الکتروفورز ژل با دستگاه Gel doc و در طول موج ۲۸۰ نانومتر، ژل از

## یافته‌ها

طالقانی جدا شدند. هم‌چنین ۵۷ (۵۷ درصد) نمونه مربوط به مردان و ۴۳ (۴۳ درصد) نمونه مربوط به زنان بود. در این مطالعه، فسفومايسين و ايمي پنم بهترین اثر را علیه سویه‌های اشرشیا کلی و نیز فسفومايسين و تیجیسکیلین بهترین اثر را علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه داشتند. الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از روش PCR برای ژن‌های کد کننده پمپ‌های تراوشی Qep A, Acr B و Acr A، میزان شیوع ژن‌های Acr A, Acr B و Qep A در سویه‌های اشرشیا کلی به ترتیب ۹۲، ۸۴ و صفر درصد و در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۹۴، ۸۷ و ۴ درصد بود.

۱۰۰ سویه اشرشیا کلی از بیماران بستری در بیمارستان‌های لبافی نژاد و طالقانی شهر تهران و ۱۰۰ سویه کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان‌های کودکان مفید و طالقانی شهر تهران در بازه زمانی ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ جدا گردید. ۷۰ (۷۰ درصد) سویه اشرشیا کلی از بیماران بستری در بیمارستان لبافی نژاد و ۳۰ (۳۰ درصد) آن‌ها از بیماران بستری در بیمارستان طالقانی جدا شدند. هم‌چنین ۳۳ (۳۳ درصد) نمونه مربوط به مردان و ۶۷ (۶۷ درصد) نمونه مربوط به زنان بود. ۵۰ (۵۰ درصد) سویه کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان کودکان مفید و ۵۰ (۵۰ درصد) آن‌ها از بیماران بستری در بیمارستان

جدول ۳. نتایج تست های حساسیت آنتی بیوتیکی برای سویه های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

| آنتی بیوتیک    | نیمه حساس تعداد(درصد) |                  | حساس تعداد(درصد) |                  | مقاوم تعداد (درصد) |                  |
|----------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
|                | اشرشیا کلی            | کلبسیلا پنومونیه | اشرشیا کلی       | کلبسیلا پنومونیه | اشرشیا کلی         | کلبسیلا پنومونیه |
| جنتامایسین     | ۱۰(۱۰)                | ۲(۲)             | ۱۰(۱۰)           | ۵۵(۵۵)           | ۸۰(۸۰)             | ۴۳(۴۳)           |
| آمیکاسین       | ۰(۰)                  | ۲(۲)             | ۸۳(۸۳)           | ۶۵(۶۵)           | ۱۷(۱۷)             | ۳۴(۳۴)           |
| ایمی پنم       | ۶(۶)                  | ۱۰(۱۰)           | ۹۱(۹۱)           | ۶۶(۶۶)           | ۳(۳)               | ۲۴(۲۴)           |
| سفوتاکسیم      | ۳(۳)                  | ۲(۲)             | ۱۶(۱۳)           | ۳۳(۳۳)           | ۸۴(۸۴)             | ۶۶(۶۶)           |
| لووفلوکسازین   | ۱۲(۱۲)                | ۱۰(۱۰)           | ۲۰(۲۰)           | ۲۰(۲۰)           | ۶۸(۶۸)             | ۷۰(۷۰)           |
| فسفومايسين     | ۵(۵)                  | ۵(۵)             | ۹۰(۹۰)           | ۸۵(۸۵)           | ۵(۵)               | ۱۰(۱۰)           |
| آمپی سیلین     | ۰(۰)                  | ۲۱(۲۱)           | ۰(۰)             | ۱۷(۱۷)           | ۱۰۰(۱۰۰)           | ۶۲(۶۲)           |
| سیپروفلوکسازین | ۴(۴)                  | ۳(۳)             | ۱۰(۱۰)           | ۱۴(۱۴)           | ۸۶(۸۶)             | ۷۳(۸۳)           |
| سفودوکسیم      | ۰(۰)                  | ۲(۲)             | ۱۲(۱۲)           | ۲۶(۲۶)           | ۸۸(۸۸)             | ۷۲(۷۲)           |
| تیجی سیکلین    | -                     | ۵۵(۵۵)           | -                | ۳۰(۳۰)           | -                  | ۱۵(۱۵)           |
| سفتازیدیم      | ۵(۵)                  | ۵(۵)             | ۱۵(۱۵)           | ۳۳(۳۳)           | ۸۰(۸۰)             | ۶۲(۶۲)           |

## بحث

دریافت داروهای نامناسب توسط بیماران و انتقال باکتری‌ها به دیگر بیماران می‌شود. از این رو، شناسایی باکتری‌های با مقاومت مخفی ضروری است. سنجش‌های مفید برای شناسایی مکانیسم‌های مقاومت مورد نیاز است. مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کلبسیلا پنومونیه شامل بتالاکتامازها، جهش در پورین‌ها و نیز پمپ‌های تراوشی هستند که پمپ‌های تراوشی به عنوان یکی از موارد اصلی دفاع این باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (۱۶، ۱۷). Acr A، Acr B و Qep A از جمله مهم‌ترین پمپ‌های تراوشی هستند که در این تحقیق وجود

به کارگیری موثر آزمایشگاه‌های میکروب شناسی برای تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم، موجب کاهش نیاز به استفاده از داروها می‌شود. کنترل عفونت برای بیماران بسیار سودمند بوده و موجب کاهش میزان مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌گردد. تجربه در آزمایشگاه میکروب شناسی برای تشخیص باکتری‌های مقاوم بسیار حیاتی است. بسیاری از باکتری‌ها ممکن است درست تشخیص داده نشوند و در تست‌های آزمایشگاهی به اشتباه مقاوم یا حساس گزارش شوند که این امر موجب

علت آن را می‌توان در نوع نمونه مطرح کرد، چرا که نمونه‌های جدا شده از بیماران سوختگی مقاومت بیشتری دارند. باید توجه داشت که حساسیت سویه‌ها نسبت به ایمی پنم و مروپنم نباید ما را در مصرف و تجویز بی‌رویه این دارو ترغیب نماید، چه بسا این گونه اقدامات باعث پیدایش و شیوع سوش‌های مقاوم به ایمی پنم و مروپنم شود. پمپ‌های تراوشی از عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون می‌باشند. میکروارگانیزم‌هایی که دارای این پمپ‌ها هستند، باعث افزایش مقاومت دارویی و در نتیجه بیماری‌زایی در بین بیماران می‌گردند و جامعه را با خطر جدی مواجه می‌کنند. بنابراین تشخیص صحیح آزمایشگاهی عامل عفونت و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای جلوگیری از شکست درمان بسیار حائز اهمیت است (۱، ۲). متأسفانه در کشور ما بروز مقاومت‌های باکتریایی و عوامل دخیل در افزایش این قبیل مقاومت‌ها آن‌چنان که شایسته است مورد بررسی و توجه قرار نگرفته است. از این رو، امروزه شاهد آن هستیم که عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های مربوط به کلبسیلا پنومونیه آمار قابل توجهی را به خود اختصاص داده‌اند. در سال‌های اخیر، بروز و شیوع پمپ‌های تراوشی افزایش پیدا کرده است. به نظر می‌رسد که موقعیت جغرافیایی در نحوه پراکنش و توزیع این ژن‌ها مؤثرند، زیرا کشورهای که به لحاظ موقعیت جغرافیایی به کشور ما نزدیک‌ترند، الگوی نسبتاً مشابهی از نظر توزیع ژن‌های Acr B, Qep A و Acr A نشان می‌دهند (۲۸، ۲۹). به نظر می‌رسد سیاست درمانی و بهداشتی بیمارستان‌ها در کشورهای مختلف می‌تواند در توزیع و انتشار ژن‌های مذکور تأثیر به‌سزایی داشته باشد. با توجه به مقاومتی که سویه‌های بالینی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در برابر فلوروکینولون‌ها از خود نشان می‌دهند و با در نظر گرفتن این که مقاومت این سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها با گذشت زمان افزایش پیدا می‌کند، استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیزم‌ها و هم‌چنین تجویز و ممارست در خصوص استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های

ژن‌های کدکننده آن‌ها به عنوان یکی از دلایل موثر در بروز مقاومت دارویی در این باکتری مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق سویه‌های کلبسیلا پنومونیه بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های فسفومايسين و تیجیسیکلین و بیشترین مقاومت را به داروی سفپودوکسیم داشتند. در این مطالعه مقاومت به سفالسپورین‌ها از جمله سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم به ترتیب ۶۱، ۶۴ و ۷۰ درصد بود که در میان سفالسپورین‌ها، سفنازیدیم آنتی‌بیوتیک نسل سوم بهترین اثر را داشت. در تحقیقی که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۳۱ و ۳۲ درصد به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند (۲۴). مقایسه میزان مقاومت در دو مطالعه نشان می‌دهد که به مرور زمان به علت کسب ژن‌های مقاوم، میزان مقاومت در سال ۲۰۱۳ افزایش یافته است. در این مطالعه، ۴۲ درصد مقاومت به جنتامایسین و ۳۳ درصد مقاومت به آمیکاسین مشاهده شد. فیض‌آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شهر تهران نشان دادند که فقط یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه به ایمی پنم مقاوم بود و ۴۴ درصد به آمیکاسین و ۲۵ درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۲۵). کارباپنم‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که در برابر ارگانیزم‌های ESBL<sup>+</sup> پایدارند. ۲۳ درصد از سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق به آنتی‌بیوتیک کارباپنم مقاوم بودند. استفاده از کارباپنم‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیزم‌های واجد ESBL، در تحقیقات علمی دیگر نیز به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، در مطالعه‌ی رستگار و همکاران در شهر تهران که در سال ۲۰۱۳ انجام شد، از ۳۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه فقط ۱۹ ایزوله (۵۴ درصد) مقاوم به ایمی پنم بودند (۲۶). هم‌چنین در مطالعه‌ی که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شهر تهران انجام دادند، مقاومت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به مروپنم ۶/۳ درصد، به ارتاپنم ۳ درصد و به ایمی پنم ۱/۱ درصد بود (۲۷). میزان مقاومت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در تحقیق رستگار و همکاران از مطالعه ما بیشتر بود که

تعیین‌سیکلین بهترین اثر را علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه داشتند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه در بیمارستان کودکان مفید بالا بود. پزشکان باید در تجویز دارو دقت لازم را داشته باشند و نمونه مورد نظر را برای انجام تست آنتی‌بیوگرام به آزمایشگاه ارسال کنند تا بهترین گزینه دارویی برای بیمار مورد استفاده قرار گیرد. کارشناسان آزمایشگاه باید تست آنتی‌بیوگرام را بر روی نمونه مورد نظر انجام دهند و در ضمن باید بتوانند مکانیسم‌های مقاومت به داروها از جمله پمپ‌های تراوشی را شناسایی کرده و به پزشکان اطلاع دهند. پرسنل آزمایشگاه و پرستاران و کسانی که با بیماران در بیمارستان در تماس هستند باید برای وجود این ایزوله‌های مقاوم مورد بررسی قرار گیرند تا در صورتی که به این باکتری‌ها آلوده هستند، درمان شوند.

### تشکر و قدر دانی

بدین وسیله محققان از پرسنل گروه میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### منابع

1. Tsai Y-K, Fung C-P, Lin J-C, Chen J-H, Chang F-Y, Chen T-L, et al. Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(4):1485-93.
2. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean journal of internal medicine*. 2012; 27(2):128-42.
3. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of Klebsiella pneumoniae LamB Porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011.
4. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of  $\beta$ -lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical Klebsiella pneumoniae isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *International journal of antimicrobial agents*. 2011; 37(4):352-5.

فلوروکینولونی به جهت تأثیری که در افزایش خطر پیدایش و شیوع ارگانسیم مقاوم به دارو دارند تا حدی شبیه برانگیز است و نیاز به بحث‌های دقیق و موشکافانه دارد. در مطالعه‌ای که کیم و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور کره انجام دادند، وجود ژن qep A به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت، تنها ۴ مورد (۰/۶ درصد) از این تعداد مثبت گزارش شد (۳۰). که این نتایج با مطالعه ما هم‌خوانی دارد. هم‌چنین در مطالعه ما و همکاران که در سال ۲۰۰۹ در کشور چین برای تشخیص ژن‌های qnr، aac(6)-Ib-cr و qepA انجام گرفت، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای سیپروفلوکسازین و لووفلوکسازین گزارش شد و از مجموع ۱۰۱ سویه بررسی شده، ۳۵ باکتری (۳۴/۷ درصد) دارای ژن‌های qepA، aac(6)-Ib-cr، qnr بودند (۲۰). از جمله مطالعات معدود در کشور ما در این زمینه مطالعه پاکزاد و همکاران در سال ۲۰۱۳ می‌باشد که نقش افلاکس پمپ AcrAB را در ۵۲ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران دچار سوختگی بررسی کرد. هم‌چنین روش PCR جهت شناسایی ژن acrA در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین استفاده شد. ۴۰ سویه (۷۶/۹۲ درصد) از باکتری‌های بررسی شده به سیپروفلوکسازین مقاوم بودند و نتایج PCR نشان داد که همه سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین ژن acrA را نیز داشتند (۲۳). در مطالعه‌ای که توسط سوییک و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تگزاس انجام شد، ۲۴۱ سویه اشرشیا کلی جهت بررسی ارتباط بین پمپ‌های تراوشی با عملکرد فلوروکینولون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی فلوروکینولون‌ها MIC انجام گردید. مقدار MIC با حذف در ژن‌های acrA، acrB کاهش یافت. نتیجه به دست آمده نشان داد که افزایش بیان acrA و acrB به طور قطع مرتبط با مقاومت فلوروکینولونی است (۳۱).

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، فسفومایسین و ایمی پنم بهترین اثر را علیه سویه‌های اشرشیا کلی و نیز فسفومایسین و



5. Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; 66(6):1411-3.
6. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(1):177-83.
7. Yang J, Ye L, Wang W, Luo Y, Zhang Y, Han L. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International journal of antimicrobial agents*. 2011; 38(4): 348-51.
8. Zhou X, Gao J, Huang Y, Fu S, Chen H. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *Afr J Microbiol Res*. 2011; 5(19): 3073-7.
9. Maramba-Lazarte CC. Etiology of neonatal sepsis in five urban hospitals in the Philippines. *PIDSP Journal*. 2011; 12(2).
10. Lubell Y, Ashley EA, Turner C, Turner P, White NJ. Susceptibility of community-acquired pathogens to antibiotics in Africa and Asia in neonates—an alarmingly short review. *Tropical Medicine & International Health*. 2011; 16(2): 145-51.
11. Green V, Verma A, Owens R, Phillips S, Carr S. 226 Structure of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1). *Acta Crystallogr Sect F*. 2011; 227:1160-4.
12. Jean S-S, Hsueh P-R. High burden of antimicrobial resistance in Asia. *International journal of antimicrobial agents*. 2011; 37(4): 291-5.
13. Fernández A, Pereira MJ, Suárez JM, Poza M, Treviño M, Villalón P, et al. Emergence in Spain of a Multidrug Resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(3):822-8.
14. Tseng S-H, Lee C-M, Lin T-Y, Chang S-C, Chang F-Y. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: think globally and act locally. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2011; 44(3): 157-65.
15. Lye D, Kwa A, Chlebicki P. World health day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. *Ann Acad Med Singapore*. 2011; 40(4): 156-2.
16. Pages J-M, Lavigne J-P, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, the masked side of  $\beta$ -Lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE*. 2009; 4(3):e4817-8.
17. Kumar V, Sun P, Vamathevan J, Li Y, Ingraham K, Palmer L, et al. Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(9): 4267-76.
18. Wang D, Wang H, Qi Y, Liang Y, Zhang J, Yu L. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* harboring *QnrB32*, *Aac (6')-Ib-cr*, *GyrA* and *CTX-M-22* genes. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2012; 50(1): 68-74.
19. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim E-C, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(2): 639-45.
20. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac (6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(2): 519-24.
21. Pasom W, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Kenprom S, Puang-Ngern P. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac (6')-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrB*, and *qnrA*, in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a teaching hospital, Thailand. *Japanese journal of infectious diseases*. 2013; 66(5): 428-32.
22. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009:dkp186.

23. Pakzad I, Karin MZ, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS hygiene and infection control*. 2013;8(2).
24. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2007; 13(11): BR247-BR50.
25. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar S-M, Mahboobi M, Nili F, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2010; 4(10):609-15.
26. Lari AR, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghebandan R. Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase among burns patients: first report from Iran. *Burns*. 2013; 39(1):174-6.
27. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezalgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Microbial Drug Resistance*. 2013; 19(1):30-6.
28. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56(3):463-9.
29. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, et al. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(6):2467-75.
30. Kim ES, Jeong J-Y, Choi S-H, Lee S-O, Kim S-H, Kim M-N, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, qepA, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009; 65(3):335-8.
31. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(2): 921-4.